

罗方园, 潘根兴, 李恋卿, 等. 洪泽湖沉积物中四环素土霉素及相关抗性基因的分布特征及潜在风险分析[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(2): 369–375.

LUO Fang-yuan, PAN Gen-xing, LI Lian-qing, et al. The distribution characteristics and potential risk of tetracycline, oxytetracycline and their corresponding genes pollution in sediment of Hongze Lake[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(2): 369–375.

洪泽湖沉积物中四环素土霉素及相关抗性基因的分布特征及潜在风险分析

罗方园^{1,2}, 潘根兴¹, 李恋卿¹, 张俊², 王娜², 焦少俊^{2*}, 张旭辉^{1*}

(1.南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2.环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042)

摘要:为了探讨洪泽湖沉积物中四环素、土霉素及其抗性基因的含量、分布及潜在风险,采集洪泽湖湖区42个沉积物样品,利用HPLC-MS测定了样本中常见的两种四环素类抗生素(四环素、土霉素)含量,并采用qPCR分析了样品中3种四环素抗性基因(*tetA*、*tetC*、*tetM*)的含量。结果显示,四环素类抗生素检出率为100%,含量范围为1.35~25.43 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。所有样品中*tetA*、*tetC*基因均有检出,且*tetC*基因含量最高,平均含量为 9.77×10^6 copies $\cdot\text{g}^{-1}$,只在部分样品中检测出*tetM*。相关结果分析表明,沉积物中的四环素类抗性基因含量与四环素类抗生素含量及有机碳的乘积呈较为明显的正相关关系($R^2=0.6694$, $n=42$),这也表明在洪泽湖水域中,四环素类抗生素抗性基因的含量水平可能不仅与环境中的抗生素暴露水平相关,也有可能与有机质含量等环境因素相关。

关键词:洪泽湖;四环素类抗生素;四环素抗性基因;HPLC-MS;qPCR

中图分类号:X524 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2017)02-0369-07 doi:10.11654/jaes.2016-1237

The distribution characteristics and potential risk of tetracycline, oxytetracycline and their corresponding genes pollution in sediment of Hongze Lake

LUO Fang-yuan^{1,2}, PAN Gen-xing¹, LI Lian-qing¹, ZHANG Jun², WANG Na², JIAO Shao-jun^{2*}, ZHANG Xu-hui^{1*}

(1.College of Resource and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2.Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China, Nanjing 210042, China)

Abstract: Antibiotic resistance genes (ARGs) have been a great concern to the environmental health in the world. This study was focus on the content, distribution and potential risk of tetracycline, oxytetracycline and the corresponding resistance genes in the sediments from the Hongze Lake, to find out the relationship between the selected antibiotics and its induced resistance genes. The sediment samples was collected in forty two spots all over the lake for the subsequent analysis. The high-performance liquid chromatography-mass spectrograph (HPLC-MS) was used to investigate the concentration of two common tetracycline antibiotics (tetracycline, oxytetracycline), moreover, quantitative real-time PCR was used to study the abundance of three typical tetracycline resistance genes in the samples. The results showed that the two tetracycline (TCs) antibiotics are detected in all samples, with the contents of tetracycline antibiotics ranging from 1.35 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ to 25.43 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The *tetA* and *tetC* genes were detected in all samples, in contrast, the *tetM* gene was partially found in some samples. Among the three genes, *tetC* gene was in a higher level than other two genes. Furthermore, the relevance analysis indicated that the abundance of tetracycline resistance genes in the sediment of Hongze Lake, were not only related to content of tetracycline antibiotics, but also to the other environmental factors as organic carbon. This result showed that the appearance of ARGs in the environment is a comprehensive process, and the elimination of ARGs should be based on the well treatment on the antibiotics as well as other ambient factors.

Keywords: Hongze Lake; tetracycline antibiotics; ARGs; HPLC-MS; qPCR

收稿日期:2016-09-24

作者简介:罗方园(1992—),女,硕士研究生,主要研究方向为土壤化学。E-mail:2013103073@njau.edu.cn

*通信作者:焦少俊 E-mail:jsj@nies.org;张旭辉 E-mail:xuhuizhang@njau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(21102053);江苏省自然科学基金项目(BK2011082)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(21102053); The Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China(BK2011082)

四环素类抗生素由于成本低廉、使用方便且具有广谱杀菌性及低毒性,而被广泛应用于农业、畜牧业^[1],在畜牧养殖中常作为抗病药物、生长促进剂等添加于饲料中。四环素进入动物体内,大部分不能被机体完全吸收,经过代谢后仍将有50%~80%以原药或者代谢物形式通过动物的粪便和尿液排出体外,进入环境中造成污染^[2-4]。有调查显示,四环素类抗生素能残留于河流湖泊等自然水体及其沉积物中^[5-14]。残留在水体环境中的四环素类抗生素除了会对水生生物产生毒性效应外,还会对环境微生物产生选择性压力,可能诱发产生大量四环素耐药细菌^[15]。耐药菌携带的四环素抗性基因能在水体中进行传递和扩散,可能会通过分子水平迁移的方式威胁人类健康^[16]。现已在多个水体及沉积物中检测到四环素类耐药菌及相关抗性基因的存在^[17-20]。

洪泽湖(33°06'~33°40'N, 118°10'~118°52'E)是中国第四大淡水湖,为淮河中下游结合部,同时也是重要的渔业、畜禽产品生产基地。湖内围网养殖面积达1.67万hm²以上,且湖区周边密集分布着大量的中小型畜禽养殖场,四环素类抗生素常作为畜禽药物大量使用。发达的养殖行业必将带来四环素类抗生素的输入,洪泽湖可能已成为重要的四环素类抗生素载体,将势必对该地区居民的生活、生产带来极大影响。因此,了解洪泽湖地区四环素类抗生素及其抗性基因污染状况显得极有必要。分析洪泽湖地区沉积物中典型四环素类抗生素(四环素、土霉素)及典型四环素类抗性基因(*tetA*、*tetC*、*tetM*)的分布及含量情况,有助于揭示四环素类抗生素及四环素抗性基因在湖泊沉积物环境中的分布规律和传播途径,将为评价其生态风险提供理论和数据支持。

1 材料与方法

1.1 采样点的布设与沉积物的采集

在洪泽湖湖区划定42个采样点,涵盖湖泊整体,如图1所示,于2013年11月在各采样点采集沉积物样品。其中1~7号点位靠近蒋坝镇区域,附近存在渔业养殖场、农贸市场、学校以及居民区等重要生产生活区域;9~13号点位位于洪泽湖湖心区域,受到外界扰动影响较小;14号点位毗邻成河乡,附近有大量养殖场、渔场;15~23号点位靠近东双沟镇、二河林场等区域,沿湖主要是农田;24~36号点位在老子山镇、明祖陵镇、临淮镇附近,周边主要是湿地公园及林场;37~42号则分布在太平镇、龙集镇附近,沿湖周边主

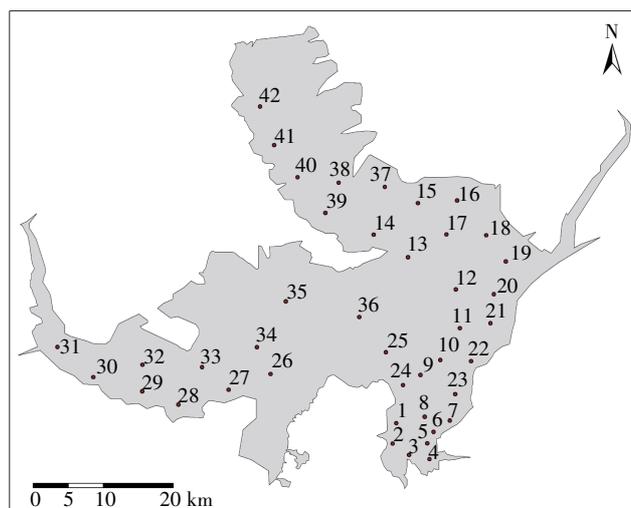


图1 洪泽湖采样分布图

Figure 1 Sediment sampling sites in Hongze Lake

要为农田。

利用蚌式采样器,采集湖底表层5 cm内土壤,每个采样点沿河道断面采集3份样品,每份150~200 g,并混合均匀。共采集42组样品,标记为1~42,采集后的样品置于无菌塑封袋中,4℃避光保存。

1.2 沉积物中四环素类抗生素残留量的分析

沉积物样品经冷冻干燥后,称取4 g样品置于锥形瓶中,利用20 mL EDTA-McIlvaine缓冲溶液进行振荡萃取,反复3次,合并提取液。利用SAX-HLB串联小柱萃取后,移去SAX柱,并使用2 mL 15%的甲醇冲洗,最终利用3 mL丙酮(含10%甲醇)洗脱抗生素。洗脱液最终置于4 mL棕色瓶中,氮吹后用甲醇定容至1 mL待测。

选取四环素和土霉素作为目标物质,利用岛津LC-2010HT高效液相色谱仪检测待测样。HPLC测定条件:色谱柱,ACQUITY UPLC BEH C18柱(1.7 μm, 2.1 mm×50 mm; Waters);柱温,35℃;流动相,乙腈(A)和0.1%甲酸/水(V/V)(B),流速0.1 mL·min⁻¹。MS检测条件:电喷雾正离子源(ESI),离子源温度120℃,脱溶剂温度350℃,脱溶剂气和锥孔气为氮气,脱溶剂气流速为600 L·h⁻¹,锥孔气流速为50 L·h⁻¹,碰撞气为高纯氦气,采用多反应监测模式(MRM)检测,进样5 μL。

1.3 沉积物中有机碳含量的测定

准确称取过0.15 mm筛的冷冻干燥样品0.2 g各5份,用总有机碳分析仪测定总碳(TC)和无机碳(IC)含量,有机碳含量(TOC)由TC与IC的差值得到。同时准确称取沉积物样品0.2 g各10份,其中5

份分别定量加入葡萄糖,另外5份不加,用总有机碳分析仪测定其中的有机碳含量,计算有机碳含量的回收率。

1.4 沉积物总 DNA 的提取

准确称取冷冻干燥处理后样品 0.25 g,按照 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (MoBio, America) 试剂盒说明书提取沉积物总 DNA,提取的 DNA 用 1.0% 琼脂糖电泳及紫外分光光度计 (UV-8000PC) 检测含量以及纯度 (A260/A280 值在 1.8~2.0 之间)。

1.5 *tetA*、*tetC*、*tetM* 基因的鉴定及 qPCR 定量分析

1.5.1 普通 PCR 反应

本研究中 *tetA*、*tetC*、*tetM* 基因测定中使用的引物均来源于已发表的文章^[17,21]。25 μL 扩增体系: 100~200 ng 沉积物总 DNA、10 \times Taq plus buffer (1.5 mmol MgCl₂)、1.5 U Taq plus DNA 聚合酶、2.5 mmol dNTP、10 μmol 上/下游引物, ddH₂O 补充体积至 25 μL 。*tetA* 基因: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 96 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。*tetC* 基因: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 59 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 结束反应。*tetM* 基因: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 45 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min 结束反应。以携带有 *tetA*、*tetC*、*tetM* 基因的细菌 DNA 作为阳性模板, 选取空白 *E. coli* DH5 α 作为阴性模板。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并与阳性及阴性对照进行比对。

1.5.2 构建 qPCR 阳性模版

采用 PCR 产物纯化试剂盒 (Sangon, China) 纯化扩增后的目标条带, 纯化后的产物连接到 *pEASY-T3* Cloning Vector (TransGen, China), 连接产物转化于 *Trans1-T1* (TransGen, China) 感受态细胞中。涂布平板, 挑选阳性克隆子接种于 LB/Amp⁺ 的液体培养基中, 过夜培养。利用 AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, America) 提取质粒 DNA, 送南京金斯瑞生物科技有限公司测序插入的基因片段。从 Internet 进入 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 站点后, 用 “Nucleotide Blast” 程序对测序序列进行同源性检索比对。

1.5.3 qPCR 定量分析

利用紫外分光光度计 (UV-8000PC) 检测提取的质粒 DNA 含量以及纯度 (A260/A280 值在 1.8~2.0 之间, 表明提取的质粒 DNA 纯度较高)。提取的质粒 DNA 按 10 倍浓度梯度稀释作为阳性反应模版, 以拷贝数的对数值为横坐标, *Ct* 值为纵坐标绘制标准曲线。得出相应基因的标准曲线为:

$$tetA \text{ 基因: } Y = -3.1066X + 36.096 (R^2 = 0.9779)$$

$$tetC \text{ 基因: } Y = -3.0189X + 34.017 (R^2 = 0.9972)$$

$$tetM \text{ 基因: } Y = -3.3078X + 40.105 (R^2 = 0.9939)$$

参照 Ultra SYBR mixture (CWbio, China) 试剂盒说明书建立 25 μL 扩增体系, 在 CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, America) 仪器上进行 qPCR 扩增。

tetA、*tetC* 基因扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 10 min 后进行 40 个循环, 每个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 最后 65 $^{\circ}\text{C}$ 升到 95 $^{\circ}\text{C}$, 其间每隔 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 采集一次荧光以生成溶解曲线, 根据溶解曲线的变化检测扩增结果的特异性。*tetM* 基因扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 10 min 后进行 40 个循环, 每个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 最后 65 $^{\circ}\text{C}$ 升到 95 $^{\circ}\text{C}$, 其间每隔 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 采集一次荧光以生成溶解曲线, 根据溶解曲线的变化检测扩增结果的特异性。

1.6 数据分析

利用 SPSS16.0 分析试验数据, 以评估可能的多重选择性压力 (有机碳含量、四环素类抗生素残留量) 对沉积物总 DNA 上四环素类抗性基因含量的影响。同时利用 *t* 检验及方差分析来比较不同组样品之间的差异。

2 结果与讨论

2.1 洪泽湖沉积物样品中四环素、土霉素的分布及总残留量

沉积物样品中四环素的检出率为 100%, 回收率为 70.4% \pm 5.7%, 检测限为 0.01 ng \cdot g⁻¹, 土霉素的检出率为 100%, 回收率为 68.3% \pm 5.6%, 检测限为 0.01 ng \cdot g⁻¹。检测得到的两种抗生素残留量均处于 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 级别, 与 Yang 等^[6]检测的珠江、Liu 等^[22]检测的贵阳南明河及 Kim 等^[23]检测的美国 Cache La Poudre 河沉积物中四环素类抗生素残留量处于同一级别。将四环素与土霉素含量之和记为沉积物样品中四环素类抗生素残留量, 各点采集的沉积物中四环素类抗生素残留量之间存在差异, 含量范围介于 1.35~25.43 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间。洪泽湖地区沉积物样品中四环素类抗生素的平均含量为 5.57 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 最高含量为 25.43 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。而在 Yang 等^[6]检测的珠江, 四环素、土霉素在旱季采集的沉积物中高达 81.7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 232 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。Liu 等^[22]检测的贵阳南明河沉积物中四环素、土霉素最高含量分别是 312 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 335 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。陈永山等^[24]检测

的太湖苕溪沉积物中的四环素、土霉素含量最高可达 $276.6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $131.6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。沈群辉等^[14]检测的黄浦江水域的沉积物中四环素类抗生素含量平均为 $33.47 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。Yang 等^[25]检测的洞庭湖、洪湖沉积物中四环素及土霉素平均含量为 $58.25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $85.98 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。综合以上数据,可以看出洪泽湖沉积物中的四环素类抗生素残留量相对低于以上所述的其他水体环境中的含量。

通过图 2 可以得出,部分沉积物采样点的四环素类抗生素含量较高,这些采样点均位于湖体南部蒋坝镇、北部成子湖等人口密集区的渔业养殖范围内,而四环素是水产养殖业中常用的抗生素,这也表明养殖业中的抗生素可通过各种排放途径进入湖体中,从而可能对湖区的环境产生潜在的不利影响。

2.2 洪泽湖沉积物样品中四环素类抗性基因的分布及含量

有研究发现抗性基因 *tetA*、*tetC* 和 *tetM* 有比较广泛的宿主范围,能够被不同环境的部分菌属携带,因此他们在环境中的检出频率相对较高^[9]。我国许多其他流域的研究中,四环素类 ARGs 的含量检测较多采用相对丰度定量法^[14,20]。且类似湖泊中沉积物内四环

素类 ARGs 定量分析研究^[25]显示,*tetA*、*tetC*、*tetM* 3 种基因检出率高,并包含了两种不同抗性机制,对四环素类抗性基因具有一定代表意义。

本研究通过普通 PCR 反应检测采集的 42 个沉积物样品中是否存在 *tetA*、*tetC* 和 *tetM* 基因,结果显示 *tetA*、*tetC* 的检出率为 100%,*tetM* 基因的检出率为 92.85%。进一步利用荧光定量 PCR 准确定量出样品中 *tetA*、*tetC* 和 *tetM* 基因的含量水平,三者的最低检测限分别为 8.17×10^4 、 7.31×10^3 $\text{copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 和 $100 \text{copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。从图 3~图 5 中可以看出,所测样品中 *tetA* 基因的含量介于 $4.37\times 10^3\sim 1.01\times 10^6 \text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 之间,*tetC* 基因的含量范围为 $2.80\times 10^5\sim 3.75\times 10^7 \text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$,*tetM* 基因的含量范围为 $8.35\times 10^2\sim 3.03\times 10^5 \text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 。分析结果发现,三种检测的四环素抗性基因中,*tetC* 含量最高,平均含量为 $9.77\times 10^6 \text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$,而 *tetA* 的平均含量为 $1.57\times 10^5 \text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$,*tetM* 的平均含量为 $4.59\times 10^4 \text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 。Yang 等^[25]检测的洞庭湖、洪湖沉积物中 *tetC* 平均含量约为 $2.0\times 10^6 \text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $4.0\times 10^4 \text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$,结果表明洪泽湖沉积物中 *tetC* 含量水平与洞庭湖较为接近。洪泽湖各组沉积物样品间四环素类抗性基因的含量水平不同,所有样品

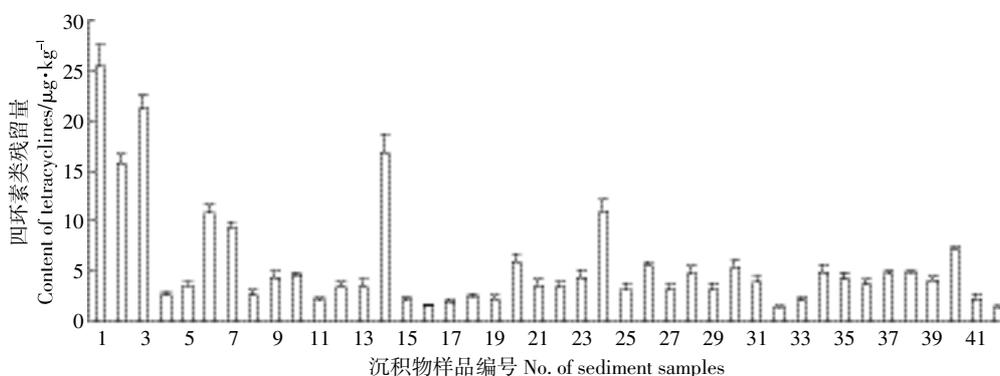


图 2 洪泽湖沉积物样品中四环素类抗生素残留量

Figure 2 Concentrations of TCs antibiotics in sediment for each sampling site in Hongze Lake

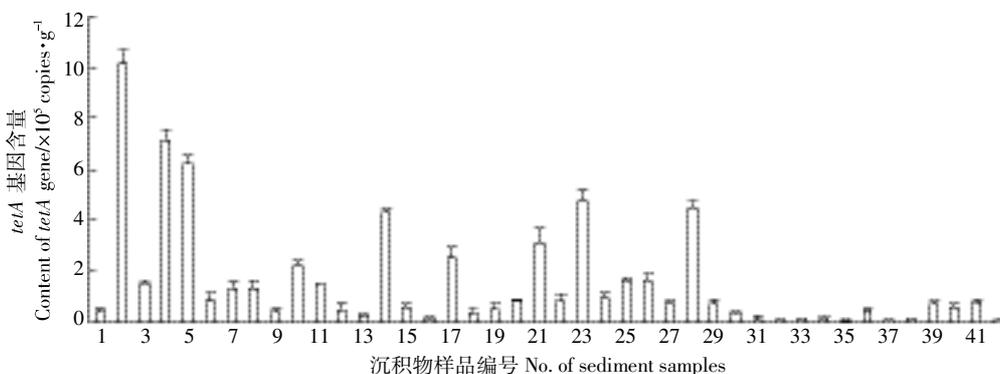
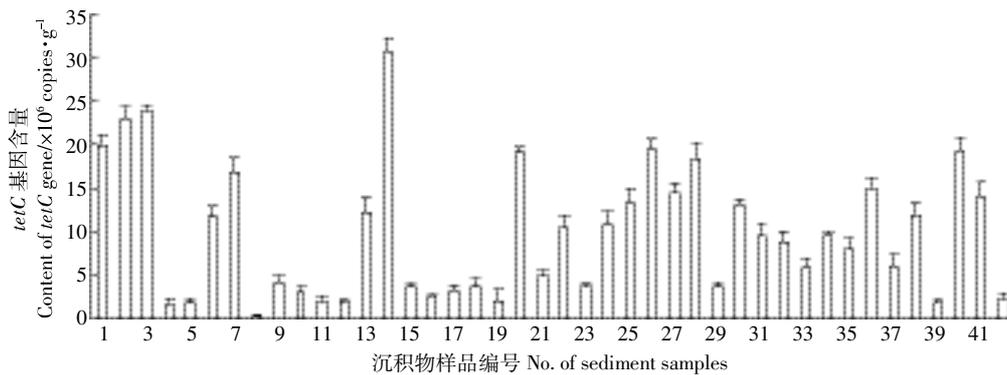
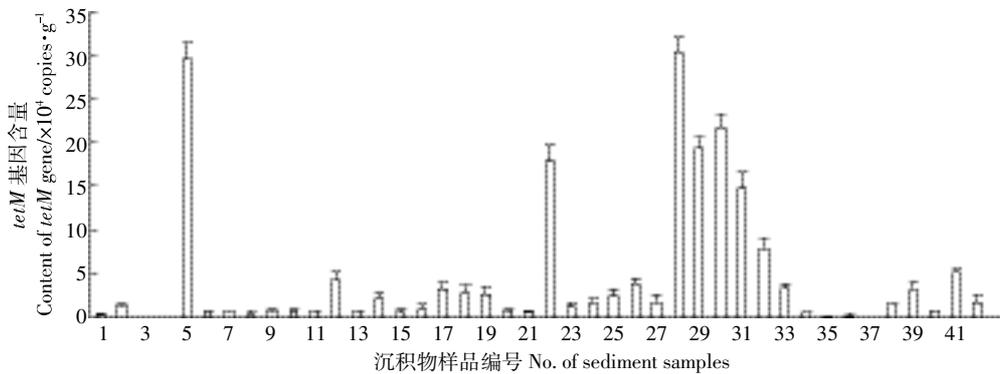


图 3 洪泽湖沉积物样品中 *tetA* 基因含量

Figure 3 Content of *tetA* genes in sediment for each sampling site in Hongze Lake

图4 洪泽湖沉积物样品中 *tetC* 基因含量Figure 4 Content of *tetC* gene in sediment for each sampling site in Hongze Lake图5 洪泽湖沉积物样品中 *tetM* 基因含量Figure 5 Content of *tetM* gene in sediment for each sampling site in Hongze Lake

中 *tetC* 基因的检出率及含量高于 *tetA* 和 *tetM*, 其结果与 Yang 等^[25]检测的洞庭湖、洪湖类似。

分析湖体各区域抗性基因的含量水平发现,在离湖岸较近的区域或养殖业较为集中的区域,几种检测的四环素抗性基因的含量相对较高,由于周边区域畜禽及水产养殖相对较发达,抗生素的使用率较高,可能会通过径流或直接施用等途径进入到湖体中,导致近岸湖体区域内耐药菌和抗性基因总体水平升高。

而在洪泽湖中心区域,由于距离外界输入型污染源远,并且沉积物主要为砂质,有机质含量少,不利于耐药细菌的生长繁殖,这些区域的四环素抗性基因检测的含量则相对较低。这些结果也表明,四环素抗性基因的含量可能与四环素的诱导有关,并可能受到其他环境条件的影响。

2.3 有机碳含量及四环素类抗生素残留对四环素类抗性基因含量的影响

本研究结果显示,四环素抗性基因的含量可能不仅与四环素的诱导有关,还可能受到其他环境条件的影响,进一步分析沉积物样品中有机碳含量可以发现,沉积物样品中有机碳平均含量为 $13.51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,各样品中有机碳的含量均处于 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 级,含量范围为

$2.31 \sim 43.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,各样品中有机碳含量如图6所示。有机碳在湖泊系统中扮演着重要角色^[26],也是反映沉积物中微生物丰度的重要指标^[27]。通过将四环素类抗生素残留量和有机碳含量,与四环素类抗性基因含量进行线性拟合,探讨四环素类抗生素残留量与有机碳含量对四环素类抗性基因含量的联合作用影响。拟合结果显示,在野外条件中四环素类抗生素残留量与抗性基因含量之间并无明显的相关关系,这与张俊等^[26]在实验室内采用同一种土壤进行试验的拟合效果不太一致,这也与其他许多研究所发现的在一定环境条件下,水体和粪便中四环素类抗生素的使用与四环素抗性基因的形成之间有很好的相关性的结果不一样^[29-30]。以上现象说明,抗生素的外源输入虽然是诱导湖体微生物产生抗性基因的重要前提,但并不是抗性基因含量的绝对影响因素。在本研究中多因素影响条件下,抗性基因含量与沉积物中四环素类抗生素残留量之间未发现存在较明显的线性关系,而前述研究的结论均基于一定的环境条件下,四环素类抗生素残留能够影响四环素类抗性基因的丰度,并未考虑可能存在的其他环境条件的选择性压力^[14]。环境条件能够直接影响产生抗性基因的微生物的生存环境,所以将沉

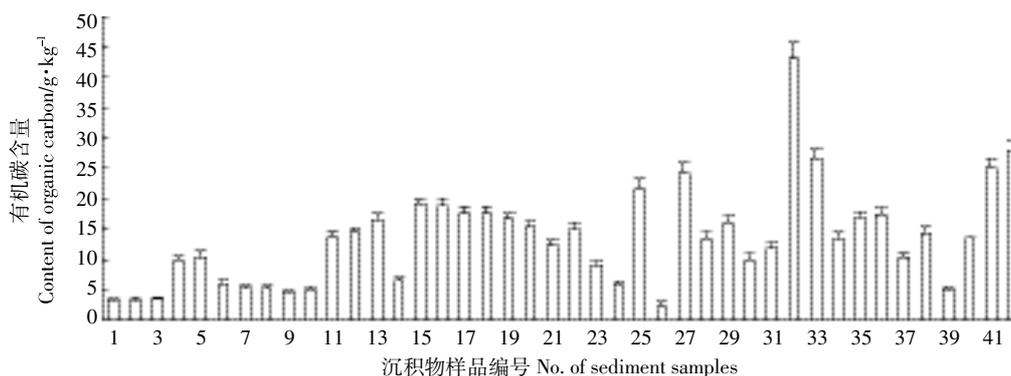


图6 洪泽湖沉积物样品中有机碳含量

Figure 6 Content of organic carbon in sediment for each sampling site in Hongze Lake

积物中有机碳含量作为重要的环境影响条件纳入进一步的相关性分析中。

进一步分析四环素类抗生素残留量与有机碳含量对抗性基因的影响,结果则发现,四环素类抗生素残留量和有机碳含量的乘积,与四环素类抗性基因的总含量(*tetA*、*tetC*和*tetM*)具有较好的正相关关系($R^2=0.6694, n=42$),如图7所示,这也说明在野外实际的环境条件下,四环素类抗性基因的形成不仅与抗生素的含量具有一定的关系,同时还可能受到环境中基质环境条件(如有机质)的影响,抗生素的外源输入污染并不一定能有效地促进抗性基因的形成,只有在合适的环境条件下,抗性细菌群落的形成才能有效促进抗性基因的形成,这也与之前的相关研究结论较为一致^[28,31]。

3 结论

(1)在洪泽湖湖区采集的42个沉积物样品,检测了四环素和土霉素两种抗生素,结果发现,湖区底泥

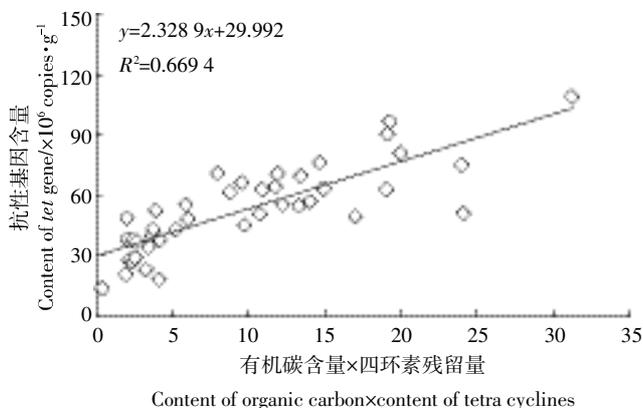


图7 四环素残留量和有机碳含量与抗性基因总量的关系

Figure 7 Relations of ARGs and the product of tetracycline residues and organic carbon

中均检出了这两种抗生素,两种抗生素的含量范围为 $1.35\sim 25.43\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

(2)分析检测了底泥样品中的四环素类抗性基因,结果发现底泥中*tetA*、*tetC*、*tetM*3种抗性基因均有检出,其中*tetC*含量相对较高,其他两种抗性基因的含量则相对较低,*tetC*含量的范围为 $2.80\times 10^5\sim 3.75\times 10^7\ \text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

(3)分析发现环境中四环素类抗性基因的含量水平不仅受到介质中抗生素暴露水平的影响,还可能受到环境中的有机质等环境条件的影响。这也表明环境中抗性基因的产生是一个综合的过程,消除抗性基因的污染不仅需要控制源头的抗生素污染,还应考虑其他环境条件的影响。

参考文献:

- [1] Schmidt A S, Bruun M S, Dalsgaard I, et al. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11):4908-4915.
- [2] Campagnolo E R, Johnson K R, Karpati A, et al. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations[J]. *Science of the Total Environment*, 2002, 299(1/2/3):89-95.
- [3] Hartmann A, Alder A C, Koller T, et al. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of *umuC* genotoxicity in the native hospital wastewater[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1998, 17(3):377-382.
- [4] Chee-Sanford J C, Aminov R I, Krapac I J, et al. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4):1494-1502.
- [5] Bu Q W, Wang B, Huang J, et al. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 262(15):189-211.
- [6] Yang J F, Ying G G, Zhao J L, et al. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC-MS/

- MS[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(16):3424–3432.
- [7] Yang J F, Ying G G, Zhao J L, et al. Spatial and seasonal distribution of selected antibiotics in surface waters of the Pearl Rivers, China [J]. *Journal of Environmental Science and Health*, 2011, 46(3):272–280.
- [8] Zhang D D, Lin L F, Luo Z X, et al. Occurrence of selected antibiotics in Jiulongjiang River in various seasons South China[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(7):1953–1960.
- [9] 范长征, 王 聪, 鲁伦慧, 等. 湘江四环素及抗性基因含量特征及其季节变化[J]. 湖南大学学报, 2015, 42(6):107–112.
FAN Chang-zheng, WANG Cong, LU Lun-hui, et al. Occurrence and seasonal changes of tetracycline antibiotics and antibiotic resistance genes in the Xiang River[J]. *Journal of Hunan University*, 2015, 42(6):107–112.
- [10] 梁惜梅, 施 震, 黄小平. 珠江口典型水产养殖区抗生素的污染特征[J]. 生态环境学报, 2013, 22(2):304–310.
LIANG Xi-mei, SHI Zhen, HUANG Xiao-ping. Occurrence of antibiotics in typical aquaculture of the Pearl River Estuary[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2013, 22(2):304–310.
- [11] Zhou L J, Ying G G, Zhao J L, et al. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in the Northern China[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(7):1877–1885.
- [12] 章 强, 辛 琦, 朱静敏, 等. 中国主要水域抗生素污染现状及其生态环境效应研究进展[J]. 环境化学, 2014, 33(7):1077–1083.
ZHANG Qiang, XIN Qi, ZHU Jing-min, et al. The antibiotic contaminations in the main water bodies in China and the associated environmental and human health impacts[J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(7):1077–1083.
- [13] Jiang L, Hu X L, Yin D Q, et al. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China[J]. *Chemosphere*, 2011, 82(6):822–828.
- [14] 沈群辉, 冀秀玲, 傅淑珺, 等. 黄浦江水域抗生素及抗性基因污染初步研究[J]. 生态环境学报, 2012, 21(10):1717–1723.
SHEN Qun-hui, JI Xiu-ling, FU Shu-jun, et al. Preliminary studies on the pollution levels of antibiotic and antibiotic resistance genes in Huangpu River, China[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(10):1717–1723.
- [15] Schnell S, Bols N C, Barata C, et al. Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1[J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 93(4):244–252.
- [16] Andersson D I, Levin B R. The biological cost of antibiotic resistance [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(5):489–493.
- [17] Luo Y, Mao D Q, Michal B, et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(19):7220–7225.
- [18] Zhang X X, Wu B, Zhang Y, et al. Class 1 integronase gene and tetracycline resistance genes *tetA* and *tetC* in different water environments of Jiangsu Province, China[J]. *Ecotoxicology*, 2009, 18(6):652–660.
- [19] Zhang X X, Zhang T, Herbert H P Fang. Antibiotic resistance genes in water environment[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(3):397–414.
- [20] 徐 艳, 张 远, 郭昌胜, 等. 石家庄汪洋沟地区抗生素、抗性细菌和抗性基因污染特征[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(6):1174–1182.
XU Yan, ZHANG Yuan, GUO Chang-sheng, et al. Pollution characteristics of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria and genes in Wangyagou River, Shijiazhuang, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(6):1174–1182.
- [21] Chen L L, Liu W Q, Liu J, et al. Study of evolution and dissemination of common tetracycline resistance *tet(M)* genes in aquaculture[J]. *Marine Sciences*, 2011, 35(12):75–81.
- [22] Liu H, Zhang G P, Liu C Q, et al. The occurrence of chloramphenicol and tetracyclines in municipal sewage and the Nanming River, Guiyang City, China[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2009, 11(6):1199–1205.
- [23] Kim S C, Carlson K. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(1):50–57.
- [24] 陈永山, 章海波, 骆永明, 等. 苕溪流域典型断面底泥 14 种抗生素污染特征[J]. 环境科学, 2011, 32(3):667–672.
CHEN Yong-shan, ZHANG Hai-bo, LUO Yong-ming, et al. Investigation of 14 selected antibiotics in sediments of the typical cross sections of Tiaoxi River[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(3):667–672.
- [25] Yang Y Y, Cao X H, Lin H, et al. Antibiotics and antibiotic resistance genes in sediment of Honghu Lake and East Dongting Lake, China[J]. *Microbial Ecology*, 2016, 72(4):791–801.
- [26] Stefan S, Renate S, Jorg O, et al. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of fresh water lakes: Molecular and cultivations studies[J]. *FEMS Microbiology*, 2000, 24:573–590.
- [27] Fu S L, Zou X M, Coleman D, et al. Highlights and perspectives of soil biology and ecology research in China[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41(5):868–876.
- [28] 张 俊, 罗方园, 熊浩徽, 等. 环境因素对土壤中几种典型四环素抗性基因形成的影响[J]. 环境科学, 2014, 35(11):239–246.
ZHANG Jun, LUO Fang-yuan, XIONG Hao-hui, et al. Effect of environmental factors on the formation of several typical tetracycline resistance genes in soil[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(11):239–246.
- [29] Jiang L, Hu X L, Xu T, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 458/459/460:267–272.
- [30] Peak N, Knapp C W, Yang R K, et al. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1):143–151.
- [31] 张 俊, 杨晓洪, 葛 峰, 等. 长期施用四环素残留猪粪对土壤中耐药菌及抗性基因形成的影响[J]. 环境科学, 2014, 35(6):346–352.
ZHANG Jun, YANG Xiao-hong, GE Feng, et al. Effects of long-term application of pig manure containing residual tetracycline on the formation of drug-resistant bacteria and resistance genes[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(6):346–352.